Mechanismen der intrazellulären isosmotischen Regulation der Aminosäurekonzentration bei dem Flußkrebs Orconectes limosus

Dietrich Siebers

1970

Mechanismen der intrazellulären isosmotischen Regulation der Aminosäurekonzentration bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dietrich Siebers
aus Stettin

UNIV. LEIDEN BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. K. Urich

2. Referent: Prof. Dr. K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung: 18. DEZ. 1970

Tag der Promotion:

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Ich danke meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. K. Urich, für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und die Bereitstellung eines Laborplatzes mit guten Arbeitsbedingungen. Seine stete persönliche Anteilnahme am Fortgang der Arbeit und die Kritik bei deren Abfassung waren mir überaus hilfreich.

Ebenso möchte ich den Angehörigen des Institutes, besonders den Herren Professoren Dr. K. Graszynski und Dr. R. Keller sowie Herrn Dr. U. Speck für ihre hilfreichen Diskussionen und ihr reges Interesse an der Durchführung der Versuche danken.

Für die Untersuchungen wurden Leihgaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Dr. Urich benutzt.

Inhalt

I. Einleitung S. 6

II. Veränderungen der osmotisch wirksamen Substanzen S. 9

III. Herkunft der während der osmotischen Adaptation vermehrten niedermolekularen organischen Substanzen S. 14

IV. Ein weiterer Nachweis der Proteinbeteiligung an der Konzentrationserhöhung der freien Aminosäuren S. 22

V. Proteinstoffwechsel während der Osmoregulation S. 25

VI. Zusammenfassung S. 36

Anhang: Material und Methoden S. 38

A. Tiermaterial und Hälterung S. 38

B. Aufarbeitung des Tiermaterials und Bestimmung der einzelnen Stoffklassen und Substanzen S. 39

C. Bestimmung des ausgeschiedenen CO_2 S. 41

D. Bestimmung des ausgeschiedenen Stickstoffs S. 41

E. Radioaktivitätsbestimmungen S. 41

Literaturverzeichnis S. 43

I. Einleitung

Bei allen Tieren ist das intrazelluläre Milieu etwa isosmotisch mit den extrazellulären Körperflüssigkeiten, und diese wiederum sind bei den meisten marinen Wirbellosen stets isosmotisch dem Außenmedium. Solche Arten sind in stark verdünntem Meerwasser wie z.B. in Brackwasser oder gar in Süßwasser nicht lebensfähig. Aber auch zu einer wirksamen Osmoregulation befähigte Arten wie z.B. die Wollhandkrabbe Eriocheir sinensis, die Strandkrabbe Carcinus maenas, die Garnele Palaemonetes varians oder alle Süßwasserbewohner können den osmotischen Druck ihrer Körperflüssigkeiten und Gewebe nicht völlig unabhängig vom Salzgehalt im umgebenden Wasser konstant halten. Die auch in natürlichen Wasseransammlungen oft recht beträchtlichen Schwankungen im Salzgehalt bewirken immer Veränderungen des osmotischen Druckes in den extrazellulären Flüssigkeiten. Diese Veränderungen sind bei Tieren, die den osmotischen Druck der Körperflüssigkeiten nicht regulieren können, ebenso groß wie die des Außenmediums und bei Tieren mit regulativen Einrichtungen kleiner. Der osmotische Druck der Zellen folgt den Veränderungen in den Körperflüssigkeiten. (FLOREY, 1970; SCHLIEPER, 1965)

Die osmotischen Eigenschaften der extrazellulären Flüssigkeiten beruhen fast völlig auf anorganischen Ionen, und deren Regulation wird als anisosmotische extrazelluläre Regulation bezeichnet. Die Osmolarität der intrazellulären Flüssigkeit wird jedoch zum erheblichen Teil durch niedermolekulare organische Substanzen verursacht, deren Konzentration regulatorisch verändert werden kann. Dadurch wird die für das intrazelluläre Milieu wichtige Ionenkonzentration viel weniger verändert als die der extrazellulären Flüssigkeit. Die bei Veränderungen des Salzgehaltes im umgebenden Wasser stattfindenden Regulationsvorgänge der Konzentration der intrazellulären niedermolekularen Bestandteile und Ionen werden als intrazelluläre isosmotische Regulation bezeichnet. (DUCHATEAU und FLORKIN, 1956; LANGE, 1968)

CAMIEN et al. (1951) und FRASER et al. (1952) fanden erhebliche Mengen freier Aminosäuren in Krebsmuskeln. Im

Schwanzmuskel von Astacus astacus decken die Aminosäuren etwa 50 % der Erhöhung des osmotischen Druckes in der Zelle, wenn er an 2-fach verdünntes Meerwasser adaptiert ist. (DUCHATEAU-BOSSON und FLORKIN, 1961)

Während stenohaline Formen wenig tolerant gegenüber Veränderungen des Salzgehaltes im Umgebungswasser sind, können mehr oder weniger euryhaline Arten entweder durch intrazelluläre isosmotische Regulation wie Mytilus, Arenicola marina und Perinereis cultrifera oder durch eine Kombination aus intrazellulärer isosmotischer und extrazellulärer anisosmotischer Regulation wie Carcinus maenas, Eriocheir sinensis und Nereis diversicolor in unterschiedlichem Maße diese Veränderungen tolerieren. (DUCHATEAU-BOSSON u. FLORKIN, 1961)

Zwar sind für Astacus astacus sowohl extrazelluläre anisosmotische (HERRMANN, 1931) als auch intrazelluläre isosmotische Regulation beschrieben (DUCHATEAU-BOSSON und FLORKIN, 1961), jedoch fehlen mir diese Befunde bei meinem Objekt, dem seit der Jahrhundertwende in Deutschland eingeführten Flußkrebs Orconectes limosus. Darüberhinaus liegen mir keine Unterlagen über ein mögliches Vorkommen dieses Tieres in Brackwasser vor. Mit der intrazellulären isosmotischen Regulation befaßt sich die vorliegende Arbeit, extrazelluläre anisosmotische Regulation darf wegen der guten Toleranz gegenüber Salzwasser und der engen Verwandtschaft mit A. astacus als ziemlich sicher angenommen werden.

Um das Verständnis der intrazellulären isosmotischen Regulationsmechanismen bemühen sich zahlreiche Untersuchungen:

- FLORKIN und SCHOFFENIELS (1965) schließen aus Versuchen an isolierten Nerven von E. sinensis, daß die Regulation der freien Aminosäuren durch eine indirekte Salzwirkung auf Enzyme des Aminosäureintermediärstoffwechsels wie z.B. Transaminasen und Dehydrogenasen bewirkt wird. Ein Nachteil dieser Experimente ist jedoch, daß die Ergebnisse an z.T. wenig gereinigten Enzympräparationen und mit unphysiologisch hohen Salzkonzentrationen gewonnen wurden.

- Die Ausscheidungsrate stickstoffhaltiger Substanzen

sinkt bei E. sinensis, wenn die Salzkonzentration im Außenmedium zunimmt und wächst, wenn die Salzkonzentration abnimmt. (FLORKIN et al., 1964)

- Veränderungen im Sauerstoffverbrauch von isolierten Kiemenmitochondrien, Kiemen und intakten Krebsen können nicht in Relation zueinander gebracht werden. (KING, 1964, 1965)

- FLORKIN et al. (1964) zeigten an Schreitbeinen von E. sinensis, der in Süßwasser und anschließend 6 Tage in Meerwasser gehalten wurde, durch Bestimmung des freien und des proteingebundenen Alanins, Prolins und Leucins, daß die Zunahme z.B. des freien Alanins mit einer ähnlichen Zunahme des gesamten Alanins verbunden ist und schließen daraus, daß Protein nicht als Quelle der Erhöhung zu betrachten ist. Unklar sind die Verhältnisse beim Prolin und Leucin, denn das proteingebundene Prolin hat bei 2 von 3 Tieren abgenommen, das Leucin sogar bei allen 3 Versuchstieren. Dennoch werten sie ihre Ergebnisse als Beweis dafür, daß die Erhöhung der Aminosäuren nicht auf Kosten des Proteins vor sich gegangen sein kann.

- SHAW schlug 1958 vor, daß die Veränderung der freien Aminosäurekonzentration in einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen freien Aminosäuren und Protein zu suchen sei. Indirekte experimentelle Befunde hierfür lieferten RAO (1969) an der Krabbe Sesarma plicatum und KANESHIRO et al. (1969) an dem marinen Ciliaten Miamiensis avidus. (s. S. 24 u. 25)

Die in der Literatur in großer Zahl beschriebenen Experimente wurden punktuell und an verschiedenen Tieren durchgeführt. Sie haben bisher keine klare Antwort auf die Frage nach dem Regulationsmechanismus und keinen Einblick in die Kinetik der hierbei stattfindenden Veränderungen von Stoffwechselprozessen gegeben. Die vorliegende Arbeit ist ein Versuch, die verschiedenen Betrachtungsweisen an einem Tier anzuwenden, verbunden mit Stoff- und Energiebilanzen für den Regulationszeitraum sowie Untersuchungen über die Kinetik der Vorgänge. Sie

ist darüberhinaus Teil eines Untersuchungsprogramms zur Biochemie der decapoden Crustaceen, das am Beispiel des Flußkrebses Orconectes limosus am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt wird.

II. Veränderungen der osmotisch wirksamen Substanzen.

Bevor die Mechanismen der intrazellulären isosmotischen Regulation analysiert werden können, müssen das Ausmaß und die Geschwindigkeit bekannt sein, mit der die osmotisch wirksamen Substanzen während der Adaptation ihre Konzentration ändern. Als solche Substanzen kommen Salze und kleine organische Moleküle in Frage, wie Aminosäuren, niedermolekulare Kohlenhydrate und organische Säuren. Deshalb wurden Tiere in Süß- und Salzwasser (Anhang A) gehalten. Als Versuchsdauer wurden 2 Zeiten gewählt: 1 Tag und 10 Tage, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß nach 1 Tag schon eine gut absicherbare Erhöhung der Konzentration der freien Aminosäuren bei Salzwassertieren festgestellt werden kann und daß nach 10 Tagen eine bereits maximale Erhöhung auf einen konstanten Endwert vorliegt. Die Aufarbeitung des Tiermaterials und die Bestimmung der osmotisch wirksamen Substanzen sind im Anhang B beschrieben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1-3 zusammengefaßt.

Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß Salzwasserkrebse bereits nach 1 Tag die Konzentration der freien Aminosäuren und der niedermolekularen Neutralzucker signifikant erhöht haben. Über die Vermehrung von Neutralzuckern während der osmotischen Adaptation und über ihre Eigenschaft als osmotisch wirksame Substanzen liegen bisher aus der Literatur keine Angaben vor. Die Neutralzucker sind nach beiden Zeitpunkten relativ stärker erhöht als die Aminosäuren, der Anteil der Aminosäuren an der Erhöhung des osmotischen Druckes ist aber wegen ihrer Ladungseigenschaften und Molekulargewichte größer als der der Neutralzucker.

Tabelle 1: Veränderungen der osmotisch wirksamen Substanzen nach 1 Tag Adaptationszeit. (Konzentrationsangaben in mg/Tier, osmotische Konzentration in mOsmol/l Gesamtflüssigkeit)

	Salz	Süß	Stat. Signifikanz P der Differenz	Versuchsgrp. (Anhang A)	Erhöhung auf (%)
osmotischer Druck	606±37	397±27	<0,0027	e	154
Aminosäuren	56,5±6,8	46,2±3,0	<0,01	f	120
	61,0±7,1	52,2±4,4	<0,0027	e	117
Neutralzucker	14,0±5,7	7,6±1,4	<0,05	f	185
	50±18	25±12	<0,0027	e	200

Anmerkung zu den Tabellen: Die Spalten " 0 ", " Salz " und " Süß " bezeichnen Meßdaten von Tieren zu Beginn des Experiments bzw. nach 1 oder 10 Tagen Hälterung in Salz- oder Süßwasser.

Tabelle 2: Veränderungen der osmotisch wirksamen Substanzen nach 10 Tagen Adaptationszeit. (Konzentrationsangaben in mg/Tier, osmotische Konzentration in mOsmol/l Gesamtflüssigkeit)

	0	Salz	Süß	Stat. Signifikanz P der Differenzen 0-Süß	0-Salz	Süß-Salz	Versuchs-grp. (Anhang A)	Erhöhung auf (%)
Trockengewicht	278	444	261		Sammelprobe		a	170
osmotischer Druck	380	667	370		"		a u. d	180
freie anorg. Substanz*	101	170	99		"		a	172
Aminosäuren	64±5	107±10	62±6	>0,05	<0,0027	<0,01	a	173
	46,2±3,0	84,8±7,1	47,2±1,8	>0,05	<0,0027	<0,0027	f	181
Neutralzucker	31±7	50±16	23±15	>0,05	<0,0027	<0,0027	a	217
	7,6±1,4	23,0±6,0	11,6±1,7	>0,05	<0,0027	<0,01	f	198
Glucose	3,2	8,9	4,0		Sammelprobe		a	222
Trehalose	27,8	41,1	19		"		a	216
organische Säuren	91	117	85		"		a	138

* als solche wurden die Veraschungsprodukte der anorganischen Ionen und der alkohollöslichen niedermolekularen organischen Substanzen bestimmt.

Die Meßdaten der Tabelle 2 für die freie anorganische Substanz (vor allem Alkali- und Erdalkalioxyde) zeigen, daß die relative Konzentrationserhöhung der anorganischen Ionen ziemlich genau der der gesamten "Intermediärprodukte" * und damit auch der der organischen Bestandteile entspricht. Die durch die "Intermediärprodukte" verursachten osmotischen Drucke der Körperflüssigkeiten (370-397 mOsmol/l) liegen etwas niedriger als der 1967 von ANDREWS an der Haemolymphe von Vergleichstieren ermittelte Wert (444 mOsmol/l). Während ANDREWS fast unbehandelte Haemolymphe für seine Bestimmungen verwendete, wurden meine Meßwerte an chemisch isolierten osmotisch wirksamen Substanzen ermittelt. Für die etwas zu niedrigen Werte mögen geringfügig verbliebenes Wasser in den Kiemen, Verluste bei der Aufarbeitung und Vernachlässigung des kolloidosmotischen Druckes verantwortlich sein. Es besteht auch die Möglichkeit, daß den quantitativ isolierten osmotisch wirksamen Substanzen gar nicht das gesamte bei der Trockengewichtsbestimmung ermittelte Wasser zur Verfügung steht.

Die Konzentrationserhöhung der organischen Säuren kann als Hinweis gewertet werden, daß wahrscheinlich alle niedermolekularen organischen Substanzen - wenn auch in unterschiedlichen Ausmaßen- an der Vermehrung der gesamten osmotischen Konzentration der Zelle beteiligt sind.

Die Auftrennung der niedermolekularen Neutralzucker auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigte für alle 3 Gruppen von Krebsen nur Glucose und Trehalose. Für das Fehlen von Galaktose sowie Maltose und Maltoseoligosacchariden, die SPECK (1969) bei Oktobertieren beschrieben hat, kann keine Erklärung gegeben werden. Die Konzentrations-

* Als "Intermediärprodukte" werden alle niedermolekularen organischen Zwischenprodukte und Salze bezeichnet. In Tabelle 2 sind sie als Trockengewicht der osmotisch wirksamen Substanzen aufgeführt. Zur Analytik s. S. 40.

angaben für Glucose und Trehalose zeigen, daß die niedermolekularen Neutralzucker proportional zunehmen, wobei Trehalose wegen der höheren Ausgangskonzentration auch die größere Absoluterhöhung aufweist. Aus den Tabellen geht weiterhin hervor, daß die Konzentration der freien Aminosäuren (46,2-64 mg/Tier) gegenüber der der niedermolekularen Kohlenhydrate (7,6-31 mg/Tier) bei den Nulltieren über das Winterhalbjahr in stärkerem Maße konstant gehalten wird. Sicher sind niedermolekulare Kohlenhydrate auch schneller mobilisierbar als freie Aminosäuren, wie aus den prozentualen Erhöhungen in den Tabellen 1 und 2 hervorgeht.

Ein Vergleich zwischen Tabelle 1 und 2 zeigt, daß bereits nach 1 Tag osmotischer Adaptationszeit 70 % der Erhöhung der osmotischen Konzentration auf den Endwert erfolgt sind. Die Aminosäuren haben erst 27 % der Erhöhung auf die Endkonzentration erreicht, die Neutralzucker dagegen schon 56 %. Daher kann folgende Reihenfolge in der Geschwindigkeit der Konzentrationsvermehrung osmotisch wirksamer Substanzen angenommen werden: Im Zeitverlauf bis zu etwa 1 Tag werden durch passiven Einstrom von Salzen anorganische Ionen im Tier vermehrt. Parallel dazu erfolgt eine schnelle Konzentrationserhöhung der niedermolekularen Neutralzucker und eine etwas langsamere Erhöhung der freien Aminosäuren. Im Zeitverlauf bis zu etwa 10 Tagen erreichen die Aminosäuren und Neutralzucker ihr Endniveau, doch ist jetzt die Geschwindigkeit der Konzentrationsvermehrung der Neutralzucker gegenüber der der Aminosäuren vermindert.

Kinetische Betrachtungen an osmotisch wirksamen Substanzen wurden bisher nur für die Konzentrationserhöhungen von Aminosäuren und Natrium angestellt. So fanden KANESHIRO et al. (1969) an dem marinen Ciliaten Miamiensis avidus, daß die freien Aminosäuren nach 20 Minuten bereits die Endkonzentration erreicht hatten, und HARRIS (1968) an dem Isopoden Sphaeroma rugicauda, daß die relative Abnahme der gesamten freien Aminosäuren sowie Haemolymph- und Gesamtnatrium bei Überführung dieser

Seewassertiere in 2 % Seewasser nach 10-24 Stunden ihr Endniveau erreicht hatte. Die relativen Konzentrationen von Natrium und freien Aminosäuren liefen ziemlich genau parallel und decken sich insofern mit meinen Befunden. Aus den eigenen Experimenten und der geschilderten Literatur ist deutlich ersichtlich, daß die Osmoregulation durch Salze und niedermolekulare organische Substanzen ein schneller Vorgang ist, dessen Hauptteil bei Krebsen etwa innerhalb von 20-30 Stunden abläuft.

Die Zusammensetzung der freien Aminosäuren nach Adaptation in Salz- bzw. in Süßwasser ist in Tabelle 3 dargestellt. Die größten Absoluterhöhungen wurden verursacht durch die Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin und ein Gemisch aus Threonin, Serin, Glutamin und Asparagin, das durch den Analysator nicht getrennt wurde. Bei Astacus machen unter ähnlichen Bedingungen folgende Aminosäuren die größten Absolutanteile an der Konzentrationserhöhung aus: Gesamte Glutaminsäuren (Glutaminsäure und Glutamin), Prolin und Alanin. (DUCHATEAU-BOSSON und FLORKIN, 1961)

III. Herkunft der während der osmotischen Adaptation vermehrten organischen Substanzen.

Die Ergebnisse des II. Kapitels werfen die Frage auf: Woher stammen die Aminosäuren, Neutralzucker und organischen Säuren, die bei Hälterung der Krebse in Salzwasser zusätzlich gebildet wurden? Als Quelle für diese niedermolekularen Substanzen kommen die verschiedenen Polymeren in Frage, die durch Hydrolyse und Umbau alle genannten Stoffe liefern könnten. Ein 20 g-Krebs weist sehr unterschiedliche Mengen an quantitativ bedeutsamen Polymeren auf: Protein etwa 1100 mg, Lipid etwa 190 mg und Polysaccharid etwa 10 mg. (SPECK und URICH, 1969 a)

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß durch verringerte Veratmung von niedermolekularen Substanzen

Tabelle 3: Die Zusammensetzung der freien Aminosäuren des Flußkrebses * nach Adaptation in Salz- bzw. Süßwasser. (Konzentrationsangaben in µMol/Tier)

	Null		1 Tg. Salz		10 Tg. Salz		10 Tg. Süß	
Ala	89,5	82,5	139	146	228	222	105	88,9
Arg	14,9	12,6	18,4	30,7	15,9	19,9	13,8	13,7
Asp+ unbest.	8,9	7,0	8,6	8,6	9,5	11,0	8,7	8,5
Cys	0,8	-	2,2	-	2,6	4,2	-	-
Glu	9,2	9,2	11,4	17,0	22,7	25,1	14,2	12,1
Gly	144	156	225	166	193	220	217	232
His	10,8	14,1	14,6	18,0	13,8	12,8	12,0	10,9
Ile	7,2	5,9	11,1	8,8	10,2	10,7	4,6	8,0
Leu	10,9	8,5	18,0	18,8	10,8	16,7	4,8	4,6
Lys	5,4	6,9	12,5	11,2	11,3	14,3	7,3	6,8
Met	21,3	19,7	22,5	24,5	33,2	37,1	29,6	19,4
Phe	6,8	4,5	7,9	7,4	7,5	9,4	5,3	3,5
Pro	66,1	68,0	84,2	75,2	158	209	31,5	25,3
Ser+Asn+ Thr+Gln	42,0	38,7	70,1	56,3	115	99,1	36,7	26,5
Tau	0,6	-	-	0,6	1,1	1,4	0,5	0,7
Tyr	12,8	9,8	16,8	15,7	15,5	15,4	9,3	7,8
Val	13,5	8,3	19,2	14,6	15,0	17,6	4,1	3,4
unbest.	26,9	20,5	23,5	31,0	19,0	22,0	24,0	24,2
Summe	492	472	705	650	881	968	528	496

* Je 2 willkürlich gewählte Tiere der Versuchsgruppe f.

deren Konzentration auf einem erhöhten Niveau gehalten wird. In diesem Fall müßte die Intensität der energieliefernden Stoffwechselprozesse und damit der O_2-Verbrauch und die CO_2-Produktion erniedrigt sein. Eine verringerte Exkretion von Stickstoff - beim Krebs kommt hierfür besonders NH_3 in Frage - würde eine Konzentrationserhöhung von N-haltigen Substanzen, also Aminosäuren, in Verbindung mit verringerter CO_2-Abgabe plausibel erscheinen lassen.

Um diese theoretischen Ansätze experimentell zu überprüfen, wurden Krebse 10 Tage in Süß- bzw. Salzwasser gehältert. Anschließend wurde neben den niedermolekularen organischen Bestandteilen auch die Konzentration der Polymeren bestimmt. (Anhang B) Eine Gruppe von Krebsen wurde zu Versuchsbeginn analysiert, um die Effekte des 10-tägigen Hungers von denen der osmotischen Adaptation abgrenzen zu können. Gleichzeitig mit diesem Experiment wurden je 3 Tiere in Süß- und Salzwasser gehalten, um das während des Versuchszeitraumes ausgeschiedene CO_2 zu bestimmen. (Anlage C) Zusätzlich wurde bei je 4 Tieren täglich die Menge des ausgeschiedenen Stickstoffs ermittelt. (Anlage D) Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung 1 zusammengefaßt.

Tabelle 4 zeigt als Gegenüberstellung die Konzentrationsveränderungen der schon in Tabelle 2 genannten niedermolekularen organischen Substanzen, zusätzlich Trockengewicht und Polymeren. Polysaccharid und Lipid wurden während des 10-tägigen Hungers in etwa gleichem Maße von Salz- und Süßwassertieren abgebaut, jedoch weisen die Salzwassertiere einen gegenüber den Süßwassertieren signifikant stärkeren Proteinabbau vor. Während die Salzwassertiere 51 mg Protein mehr abgebaut haben als die Süßwassertiere, haben sie 45 mg mehr freie Aminosäuren. Derartige Bilanzversuche zwischen Polymeren und den gesamten niedermolekularen organischen Substan-

zen sind für die Osmoregulation bisher noch nicht in dieser Vollständigkeit angestellt worden.

In Tabelle 5 sind die pro Tag verbrauchten Nährstoffe, die resultierende CO_2-Produktion und der zugehörige Energiegewinn dargestellt. Bei der Berechnung wurde vorausgesetzt, daß 1 mg Protein 2 mg CO_2 und 4,1 cal liefert, 1 mg Kohlenhydrat 1,6 mg CO_2 und 4,1 cal, 1 mg Lipid 2,8 mg CO_2 und 9,3 cal, und daß niedermolekulare organische Säuren sich energetisch etwa wie Kohlenhydrate verhalten.

Die aus dem Nährstoffverbrauch berechnete CO_2-Produktion stimmt hinreichend mit der direkt gemessenen überein. Während die CO_2-Ausscheidung bei Salzwassertieren um 20-22 % reduziert ist, beträgt der entsprechende Energieverlust nur ca. 13 %. Dies erklärt sich aus dem höheren Lipidanteil an der veratmeten Substanz bei den Salzwassertieren. Eine Verminderung der Stoffwechselaktivität in konzentrierterem Medium wurde für Astacus astacus 1933 durch SCHWABE beschrieben.

Die täglich ausgeschiedene Menge an NH_3 und Gesamtstickstoff ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Salzwassertiere haben über den Zeitraum gemittelt 1,05 mg N/ Tier · Tag ausgeschieden, die Süßwassertiere 1,06 mg. Die gefundenen Daten für die Stickstoffausscheidung während vergleichbarer Beobachtungszeiträume stimmen mit Literaturwerten gut überein: Carcinus scheidet 1,1 mg N/25 g Fr.gew. · Tag aus (BINNS, 1969), Eriocheir in Süßwasser 1,23 mg N/20 g Fr.gew. · Tag. (Berechnet aus Daten von FLORKIN et al., 1964)

Die rapid abnehmende Ausscheidungsrate stickstoffhaltiger Substanzen im Verlauf der ersten Tage hat auch EMERSON 1969 bei dem marinen Anneliden Nephtys caeca und dem Mollusken Macoma inconspicua beobachtet und erklärt sie durch das Hungern der Tiere. FLORKIN et al. beschrieben 1964 für E. sinensis und EMERSON 1969 für N. caeca, M. inconspicua und den Mollusken Mya arenaria eine starke Vermehrung des ausgeschiedenen Stickstoffs,

Tabelle 4: Veränderungen von niedermolekularen organischen Substanzen und Polymeren nach 10 Tagen Adaptationszeit.(Konzentrationsangaben in mg/Tier)

				Stat. Signifikanz P der Differenzen			Versuchs-grp.
	0	Salz	Süß	0-Süß	0-Salz	Süß-Salz	(Anhang A)
Trockengewicht	6600±250	6600±330	6450±180	>0,05	-	>0,05	d
Aminosäuren	64±5	107±10	62±6	>0,05	<0,0027	<0,01	a
Neutralzucker	31±7	50±16	23±15	>0,05	<0,0027	<0,0027	a
organische Säuren	91	117	85		Sammelprobe		a
Protein	1044±51	909±54	960±68	<0,0027	<0,0027	<0,05	a
Lipid	202±15	150±12	149±10	<0,0027	<0,0027	>0,05	a
Polysaccharid	24±18	6±3	4±3	<0,0027	<0,0027	>0,05	a

Tabelle 5: Nährstoffverbrauch und CO_2-ausscheidung (mg/Tier . Tag) sowie Energiegewinn (cal/Tier . Tag) nach 10 Tagen Hunger bei Süß- und Salzwassertieren.

	Süß			Salz		
	Nährstoff-verbrauch	CO_2-aus-scheidung	Energie-gewinn	Nährstoff-verbrauch	CO_2-aus-scheidung	Energie-gewinn
Aminosäuren	0,2	0,4	0,8	-4,3	-8,6	-17,6
Neutralzucker	0,8	1,3	3,3	-1,9	-3,2	-7,6
organische Säuren	0,6	1,0	2,5	-2,6	-4,2	-10,6
Protein	8,4	16,8	34,4	13,5	27,0	55,4
Lipid	5,3	14,8	49,3	5,2	14,6	48,4
Polysaccharid	2,0	3,2	8,2	1,8	2,9	7,4
Summe		37,5	98,5		28,5 (-24%)	85,4 (-13%)
CO_2-bildung direkt gemessen		39,3			30,5 (-22%)	

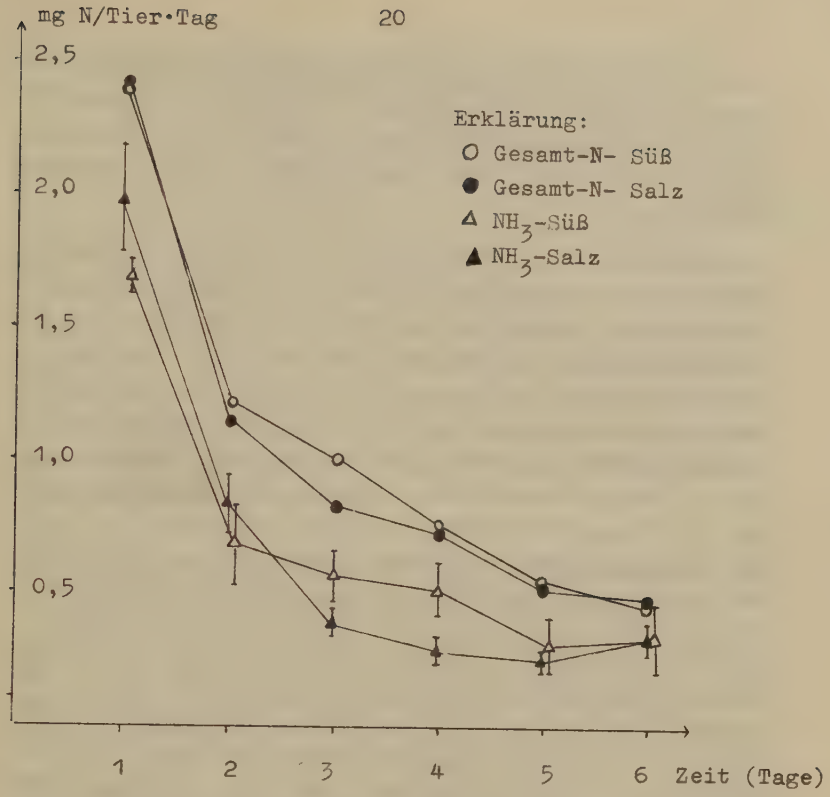

Abb. 1: Die Ausscheidung von NH_3 und Gesamt-N in Süßwasser und 650 mosmol. künstlichem Meerwasser.

wenn diese Seewassertiere in ein verdünnteres Außenmedium überführt wurden. Daß im umgekehrten Fall bei einer Überführung in ein konzentrierteres Außenmedium die Stickstoffausscheidung in gleicher Weise vermindert sein muß, ist damit nicht erwiesen. FLORKIN et al. fanden 1964 bei E. sinensis, der an Süßwasser adaptiert war, eine Abnahme der ausgeschiedenen Stickstoffmenge bei Überführung in ein konzentrierteres Medium. Diese Abnahme muß aber nicht durch osmotische Adaptation bedingt sein, denn Vergleichstiere in Süßwasser wurden nicht gehalten, so daß eine Abnahme durch Hungereffekte gut möglich ist. EMERSON konnte 1969 bei den marinen

Mollusken Thais emarginata, Littorina sitchana und Acmaea scutum zwar eine starke Reduktion der Stickstoffausscheidung bei Überführung von 100 in 150 % Seewasser feststellen, jedoch keine Zunahme bei den freien Aminosäuren.

Aus der geschilderten Literatur ist kein Zusammenhang zwischen Aminosäureerhöhung und verringerter Ausscheidung von Stickstoff zu erkennen, wenn Tiere in ein konzentrierteres Medium überführt werden. Es mag wahrscheinlich sein, daß Tiere bei abnehmender Salzkonzentration des Umgebungswassers die intrazelluläre Aminosäurekonzentration dadurch relativ schnell senken, daß sie im Regulationszeitraum Aminosäuren bevorzugt veratmen. Die eigenen Befunde weisen jedoch darauf hin, daß der umgekehrte Weg einer verringerten Aminosäureveratmung und damit einer Verminderung des ausgeschiedenen Stickstoffs nicht beschritten wird, um die intrazelluläre Aminosäurekonzentration zu heben. Schon die Menge des ausgeschiedenen Stickstoffs reicht nicht aus, wesentlich zur Vermehrung der freien Aminosäuren beizutragen. 1 mg pro Tag ausgeschiedenen Stickstoffs entspricht etwa 7 mg Aminosäuren. Bei einer Aminosäurevermehrung um 4,5 mg pro Tag müßte also die N-ausscheidung auf ca. 1/3 vermindert werden, um den Stickstoffanteil bei den Aminosäuren zu decken.

Die geschilderten Ergebnisse ermöglichen eine Kohlenstoff- und eine Stickstoffbilanz für den Regulationszeitraum. Bei der Kohlenstoffbilanz muß man davon ausgehen, daß die Substanzen ineinander umwandelbar sind. Mit ihr allein kann keine eindeutige Aussage über die vermehrten Aminosäuren, Neutralzucker und organischen Säuren aus den einzelnen Polymeren gewonnen werden. Aus der Tatsache jedoch, daß die Salzwassertiere insgesamt 5,6 mg Substanz/Tier · Tag (entsprechend 11,2 mg CO_2) weniger veratmet haben als die Süßwassertiere und daß damit der direkt gemessene Unterschied in der CO_2-ausscheidung von 8,8 mg verhältnismäßig gut übereinstimmt, kann die gesamte Bilanz, bestehend aus der Zunahme der nieder-

molekularen organischen Substanzen, verstärktem Proteinabbau und verminderter CO_2-Produktion als gesichert gelten. Mit Hilfe der Stickstoffbilanz ist es eher möglich, die Herkunft der Aminosäuren zu ermitteln, die bei den Salzwassertieren vermehrt wurden: Die Vermehrung der freien Aminosäuren um 45 mg/Tier binnen 10 Tagen deckt sich recht gut mit der Abnahme des Proteins um 51 mg/Tier im gleichen Zeitraum. Da die Ausscheidung N-haltiger Substanzen bei Süß- und Salzwassertieren quantitativ etwa gleich ist, muß das Protein als Quelle für die erhöhte Aminosäurekonzentration der Salzwassertiere betrachtet werden. Die Zunahme der Neutralzucker und organischen Säuren wird durch die Verminderung der Atmungsintensität gedeckt.

IV. Ein weiterer Nachweis der Proteinbeteiligung an der Erhöhung der freien Aminosäurekonzentration.

Nachdem die im III. Kapitel geschilderte Stoffbilanz das Protein als eine Quelle der vermehrten freien Aminosäuren gezeigt hatte, mußte versucht werden, diese Ergebnisse durch ein davon unabhängiges Experiment weiter zu sichern. Hierzu soll die in Tabelle 3 dargestellte Zusammensetzung der freien Aminosäuren verwendet werden.

Die nicht-essentiellen Aminosäuren Alanin, Glycin, Glutaminsäure und Asparaginsäure, die einen wesentlichen Anteil der Absoluterhöhung ausmachen, können im Tier aus Glucose und Pyruvat gebildet werden, wie GILLES und SCHOFFENIELS (1968) am isolierten ventralen Nervenstrang des Hummers nach Inkubation mit ^{14}-Glucose und ^{14}-Pyruvat gezeigt haben. Die Möglichkeit der Synthese dieser nicht-essentiellen Aminosäuren aus Glucose, Pyruvat und anderen Stoffwechselmetaboliten zusammen mit dem Nachweis einer direkten Salzwirkung auf die synthetisierenden Enzyme veranlaßte FLORKIN und SCHOFFENIELS (1969), grundsätzlich die Neusynthese von Aminosäuren während der osmotischen Adaptation innerhalb des Intermediärstoffwechsels anzunehmen. Offenbar versäumten sie aber

bisher, auch die Konzentrationserhöhung von essentiellen, im wesentlichen proteingebundenen Aminosäuren in die Argumentation aufzunehmen.

ZANDEE ermittelte 1965 aus dem Fehlen einer Inkorporation von ^{14}C-Acetat und ^{14}C-Glucose in proteingebundene Aminosäuren des Flußkrebses Astacus astacus Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Lysin, Histidin und Phenylalanin als essentiell. Das vermehrte Auftreten dieser essentiellen Aminosäuren nach osmotischer Adaptation sollte also Beweis sein für ihre Herkunft aus dem Protein, da sie durch den Krebs selbst nicht synthetisiert werden können. Unter Verwendung von Proteindaten, die THOMPSON und FARRAGUT (1966) für Callinectes sapidus beschrieben haben, wurde die Menge Protein berechnet, die der Konzentrationserhöhung der einzelnen essentiellen Aminosäuren entspricht. Durch Abbau der freigesetzten Aminosäuren werden die berechneten Proteinmengen in Richtung auf zu niedrige Werte verfälscht. Es sind entsprechend unterschiedlicher Abbaugeschwindigkeit der einzelnen Aminosäuren also unterschiedliche Proteinwerte zu erwarten. Der höchste gefundene Wert stellt die minimale Proteinmenge dar, die zur Gesamtkonzentrationserhöhung der Aminosäuren hydrolysiert wurde. In Tabelle 6 sind die mittleren Konzentrationserhöhungen von essentiellen Aminosäuren nach 1- und 10-tägiger Adaptation in Salzwasser gegenüber den entsprechenden Süßwassertieren dargestellt, dazu die Menge Protein, die nötig ist, um diese Konzentrationserhöhung zu bewirken. Die Werte wurden der Tabelle 3 entnommen.

Tabelle 6 zeigt, daß alle erfaßten essentiellen Aminosäuren vermehrt wurden. Die berechneten Proteinmengen schwanken entsprechend der Abbaurate der Aminosäuren. Offenbar unterliegt Histidin anfänglich einem recht geringen Abbau, denn eine Vermehrung um 3,9 µMol entspricht einer hydrolysierten Proteinmenge von ca. 27 mg während der 1-tägigen Adaptation in Salzwasser. Diese Menge erscheint hoch, jedoch haben die entsprechenden Tiere die freien Aminosäuren und Neutralzucker

Tabelle 6: Mittlere Zunahme essentieller Aminosäuren (µMol/Tier) und daraus berechneter Abbau von Protein (mg/Tier) nach 1- bzw. 10-tägiger Adaptation in Salzwasser.

	Null - 1 Tag Salz		10 Tage Süß - 10 Tage Salz	
	Zunahme der Aminosäuren	Proteinabbau	Zunahme der Aminosäuren	Proteinabbau
His	3,9	27,2	1,9	13,1
Ile	3,3	10,0	4,2	12,5
Leu	8,8	17,0	9,0	17,5
Lys	5,7	12,3	5,8	12,4
Phe	2,0	8,5	4,0	17,0
Val	6,0	14,5	12,6	30,2

---

um insgesamt 33,8 mg erhöht, eine nennenswerte Polysaccharidhydrolyse kann nach 1-tägiger Hälterung nicht nachgewiesen werden, zumal spätere Tracerversuche zeigen, daß Tiere in Salzwasser mehr Aminosäuren in Kohlenhydrat überführen als vergleichbare Süßwassertiere. Nach 10-tägiger Adaptation sind auch die essentiellen Aminosäuren z.T. abgebaut worden, so daß wohl alle Proteinwerte zu niedrig sind. Jedoch stimmen die ermittelten Zahlen von ca. 27 mg Protein nach 1 Tag und ca. 30 mg nach 10 Tagen Adaptation im Hinblick auf die indirekte Nachweismethode recht gut mit der Tabelle 4 überein, die einen um 51 mg stärkeren Proteinabbau der Salzwassertiere innerhalb von 10 Tagen gegenüber den Süßwassertieren vorweist.

Eine Konzentrationserhöhung auch der genannten essentiellen Aminosäuren fanden DUCHATEAU-BOSSON und FLORKIN (1961) bei Astacus astacus nach osmotischer Adaptation.

RAO et al. (1969) wiesen in der Haemolymphe der Krabbe Sesarma plicatum nach 3 Wochen Haltung ohne Fütterung in Süßwasser außer Threonin nur nicht-essentielle Aminosäuren chromatographisch nach, in 50 % Meerwasser zusätzlich Valin, Methionin, Dihydroxyphenylalanin und Tyrosin, in 100 % Meerwasser zusätzlich Isoleucin, Leu-

cin, Phenylalanin und Tryptophan.

Der marine Ciliat Miamiensis avidus hat eine osmotische Adaptationszeit von 20 Minuten in 100 und 150 % Meerwasser, in der die Konzentrationsverminderung bzw. -vermehrung der freien Aminosäuren ihr Endniveau erreicht. Neben den nicht-essentiellen werden auch die essentiellen Aminosäuren in 150 % Meerwasser vermehrt, jedoch werden keine ^{14}C-Aminosäuren aus dem Umgebungswasser aufgenommen. KANESHIRO et al. (1969) deuten den Mechanismus der Zunahme freier Aminosäuren nach Erhöhung der Salzkonzentration als " Mobilisierung der Aminosäuren aus dem Protein oder anderen gebundenen Zuständen der Zelle. "

In der gesamten mir vorliegenden Literatur finden sich keine Hinweise, daß die Konzentration von essentiellen Aminosäuren während der osmotischen Adaptation in konzentrierterem Medium nicht zugenommen hätte.

V. Proteinstoffwechsel während der Osmoregulation.

Die Ergebnisse der Kapitel III. und IV. hatten gezeigt, daß das Protein wesentlich an der erhöhten Aminosäurekonzentration der Salzwassertiere beteiligt ist. Um nun den Mechanismus dieser Konzentrationserhöhung kennenzulernen, mußte versucht werden, Veränderungen des Stoffwechsels zwischen dem Protein und den Aminosäuren zu erfassen. Theoretisch sind verschiedene Möglichkeiten denkbar: Wenn die Aminosäuren von Süß- und Salzwassertieren in etwa gleichem Maße veratmet werden, könnte die Erhöhung der stationären Aminosäurekonzentration auf einer Verminderung der Einbaurate ins Protein, auf einer Steigerung der Abbaurate oder auf einer Kombination beider Effekte beruhen. Die Bestimmung der Abbaurate mit z.B. ^{14}C-Leucin vormarkiertem Protein ist innerhalb des kurzen Meßzeitraumes von einem Tag, an dem die Hauptregulationsvorgänge ablaufen, nicht möglich, da die erwarteten Veränderungen der Abbaurate wesentlich kleiner sind als der erwartete Fehler der Bestimmungsmethode. Durchführbar ist aber die Bestimmung der Einbaurate

von Aminosäuren ins Protein mit Hilfe von Tracern. Ergibt sich bei diesen Messungen, daß die Einbaurate ins Protein bei den Salzwassertieren im Vergleich zu den Süßwassertieren gleich oder sogar erhöht ist, muß eine Erhöhung der Abbaurate postuliert werden. Das experimentelle Vorgehen ergibt sich aus den bisherigen Ergebnissen: Der Zeitpunkt des Versuches muß in der Hauptadaptationszeit liegen; es wurden Tiere verwendet, die 23 Stunden in Salz- und Süßwasser gehalten worden waren. (Tiere der Versuchsgruppe e) Die Verwendung eines Aminosäuregemisches gegenüber einer einzigen Aminosäure hat den Vorteil, daß alle Aminosäuren an der Markierung des Proteins beteiligt sind und nur geringe Konzentrationen verwendet werden müssen. Bei den injizierten Aminosäuren handelte es sich um ein Proteinhydrolysat der Grünalge Chlorella vulgaris, die mit $^{14}CO_2$ als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen war. Die Versuchsdauer selbst mußte kurz sein, um möglichst nur eine Stoffwechselrichtung von ^{14}C-Aminosäuren experimentell zu untersuchen. Deshalb wurden die Tiere eine Stunde nach der Injektion in -70°C Heptan getötet. Um eine rasche Verteilung des ^{14}C-Materials im ganzen Tierkörper zu erreichen, wurde es nicht per os verabreicht, sondern in den Pericardialsinus injiziert, so daß die ^{14}C-Aminosäuren mit der Haemolymphe im Tierkörper transportiert wurden.

Die anschließende Aufarbeitung des Tiermaterials und des Hälterungswassers sollte Aufschlüsse über die Geschwindigkeit der Stoffwechselwege aus den Aminosäuren, insbesondere ins Protein, geben. Mit einschneidenden Veränderungen der Einbaurate kann keinesfalls gerechnet werden: Aus den Ergebnissen des II. Kapitels ist ersichtlich, daß ein 20 g-Krebs die Menge freier Aminosäuren um etwa 10 mg in 24 Stunden erhöht, das bedeutet die Vermehrung um ca. 0,5 mg innerhalb der einstündigen Versuchsdauer. SPECK und URICH (1969 b) fanden nach Injektion von ^{14}C-Glutamat 34 % der injizierten Aktivität nach 3 Stunden im Protein. Nimmt man stark vereinfachend an, daß die Einbaurate der gesamten Aminosäuren

sich so verhält wie die des Glutamats und der Ausbau unberücksichtigt bleiben kann, so werden in 1 Stunde ca. 11 % einer durchschnittlich vorhandenen Aminosäuremenge von ca. 50 mg ins Protein incorporiert, das sind ca. 5,5 mg. Es blieb nun abzuwarten, ob die mögliche Verringerung der Einbaurate von 5,5 mg Aminosäuren/Stunde um 0,5 mg in den Bestimmungen erfaßt werden konnte.

Dieser Versuch mußte außerdem unter einer Reihe von Voraussetzungen durchgeführt werden:

1. Es wurde angenommen, daß die injizierten Aminosäuren sich zum Zeitpunkt der Injektion völlig mit den im Körper vorhandenen Aminosäuren durchmischten und einen einheitlichen Aminosäurepool bildeten. Zumindest mußte die bis zur Durchmischung verstrichene Zeit sehr kurz sein gegenüber der 1-stündigen Versuchszeit.

2. Die Gesamtaktivität in den Aminosäuren verringert sich während des Versuches in Form einer e-Funktion, beginnend zum Zeitpunkt der Injektion mit 100 % der injizierten Aktivität bis zu dem am Ende des Versuches gefundenen Wert.

3. Die Gesamtaktivität im Protein steigt an. Man darf jedoch keinen konstanten Sättigungswert erwarten wie bei einer kontinuierlichen Infusion, sondern ein zeitliches Maximum, weil ständig die ^{14}C-Aktivität in den Aminosäuren durch den Einbau und die Zufuhr inaktiver Aminosäuren aus abgebautem Protein verringert wird.

Einzelheiten der Radioaktivitätsbestimmungen im Hälterungswasser und in den Stoffklassen der Tiere sind im Anhang E, die chemischen Konzentrationsbestimmungen im Anhang B beschrieben. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments.

Es sind jeweils die Konzentrationen der einzelnen Stoffklassen und die Gesamtaktivität gegenübergestellt. Die Menge an ausgeschiedenem CO_2 wurde nicht ermittelt,

weil vorhergehende Ergebnisse darüber vorlagen und die Bestimmung innerhalb einer Stunde bei einer so großen Zahl von Tieren technisch nur unzureichend möglich ist. Dasselbe gilt für die Isolierung und quantitative Bestimmung der organischen Säuren, weil sehr viele niedermolekulare organische Säuren flüchtig sind und beim Einengen in saurer Lösung verlorengehen. Das Maß dieser Verluste ist nur unzureichend abzuschätzen. Die Radioaktivität in den organischen Säuren und im CO_2 wurde jedoch bestimmt. Rechnerisch wurde dann die Menge Aminosäuren ermittelt, die pro Stunde in die Stoffklassen und ins CO_2 inkorporiert wurde. Sie berechnet sich allgemein nach folgender Gleichung:

$$AS_{\rightarrow x} = AS_t \cdot \frac{R_x}{100} \qquad (1),$$

worin $AS_{\rightarrow x}$ die in die Körpersubstanz x inkorporierte Menge an Aminosäuren (mg) ist, AS_t die Gesamtmenge freier Aminosäuren (mg), R_x die Gesamtradioaktivität in der Stoffklasse x (% der injizierten Aktivität). Die im Nenner stehenden 100 % der Ausgangsaktivität ergeben aber einen Rechenwert, der davon ausgeht, daß über den Zeitverlauf die Gesamtaktivität in den Aminosäuren unverändert bleibt. Deshalb wurde statt 100 % die mittlere Gesamtaktivität in den Aminosäuren $\bar{R}_{AS}$ während des Versuches verwendet. Sie wurde rechnerisch ermittelt, dabei jedoch berücksichtigt, daß die Gesamtaktivität in den Aminosäuren exponentiell von 100 % auf den gefundenen Endwert absinkt. So verändert lautet Gleichung (1) nunmehr:

$$AS_{\rightarrow x} = AS_t \cdot \frac{R_x}{\bar{R}_{AS}} \qquad (2)$$

Die insgesamt umgewandelte, d.h. in die Stoffklassen $x_1 \ldots x_i$ inkorporierte Menge an Aminosäuren $AS_{\rightarrow x_1 \ldots x_i}$ beträgt:

$$AS_{\rightarrow x_1 \ldots x_i} = AS_t \cdot \frac{\sum_1^i R_{x_i}}{\overline{R}_{AS}} \qquad (3\ a)$$

Wegen $\sum_1^i R_{x_i} = 100 - R_{AS}$ (4)

kann Gleichung (3 a) auch umgeformt werden zu:

$$AS_{\rightarrow x_1 \ldots x_i} = AS_t \cdot \frac{(100 - R_{AS})}{\overline{R}_{AS}} \qquad (3\ b).$$

Als weitere Näherung müßte der Proteinabbau herangezogen werden, doch liegen hierüber keine Meßwerte vor. Aus dem Gesagten wird deutlich, daß die gefundenen Werte nur als grobe Schätzwerte angesehen werden dürfen. Da die Bestimmungen und Rechenoperationen aber an Tieren, die sich nur in osmotischer Hinsicht unterschieden, in gleicher Weise durchgeführt wurden, können auch die gefundenen Relativwerte eine Antwort auf die Frage nach den Veränderungen des Stoffwechsels aus den Aminosäuren geben.

Tabelle 7 zeigt, abgesehen von den schon in Tabelle 1 geschilderten Konzentrationserhöhungen der Aminosäuren und Neutralzucker, keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen von Lipid, Polysaccharid und Protein. Die bei den Salzwassertieren erhöhte Gesamtaktivität in den Aminosäuren darf nicht zu dem Fehlschluß verleiten, daß die Umwandlung der Aminosäuren in andere Stoffklassen vermindert ist, denn wegen der höheren Ausgangskonzentration von Aminosäuren wurde das injizierte ^{14}C-Material bei den Salzwassertieren in stärkerem Maße verdünnt. Wenn etwa gleiche oder geringfügig erhöhte Gesamtaktivitäten wie z.B. in den Neutralzuckern, im Lipid und im gesamten CO_2 (freies + gebundenes CO_2) der Salzwassertiere gefunden werden, so mußten diese Gesamtaktivitäten

wegen der oben genannten stärkeren Verdünnung der Aminosäuren mit einer größeren Aminosäuremenge erreicht werden. Dieser Hinweis wird deutlich beim Betrachten der Aminosäuremengen, die in andere Stoffklassen inkorporiert bzw. als CO_2 veratmet wurden. Sie sind bei den Salzwassertieren gegenüber den Süßwassertieren stets erhöht, wenn auch statistische Sicherungen nur für Lipid und Neutralzucker gefunden werden konnten. Die Erhöhungen betragen ca. 11 % für CO_2, 50 % für Lipid, ca. 12 % für Polysaccharid, ca. 6 % für Protein, ca. 13 % für Neutralzucker und ca. 8 % für die organischen Säuren. Betrachtet man die Aminosäuren, so ist die Menge insgesamt umgewandelter Aminosäuren um ca. 6 % bei den Salzwassertieren erhöht. Aus der teilweise nur geringfügig veränderten Geschwindigkeit des Stoffwechsels aus den Aminosäuren in die einzelnen Stoffklassen wird verständlich, daß die Differenzen nur in 2 von 6 Fällen statistisch gesichert werden konnten. Dennoch scheinen mir die angeführten Daten ausreichend zu sein, um anzunehmen, daß alle Stoffwechselwege aus den Aminosäuren beschleunigt sind, wenn deren stationäre Konzentration erhöht ist. Jedenfalls wird deutlich, daß der Einbau von Aminosäuren ins Protein bei den Salzwassertieren nicht vermindert ist. Die Erhöhung der stationären Konzentration der freien Aminosäuren während der osmotischen Adaptation muß also auf Beschleunigung des Proteinabbaus zurückgeführt werden.

In der Vermehrung der freien Aminosäuren um ca. 10 mg während eines Tages sind etwa 2,5 mg essentielle und 7,5 mg nicht-essentielle Aminosäuren enthalten, das bedeutet bei einer mittleren Aminosäuremenge von ca. 50 mg/Tier, daß die Menge freier Aminosäuren um ca 15 % an nicht-essentiellen, dem Stoffwechsel zugänglichen Aminosäuren erhöht wurde. Dieser Erhöhung steht die oben geschilderte Beschleunigung der Stoffwechselgeschwindigkeiten aus den Aminosäuren gegenüber, so daß die Vermutung naheliegt, daß die Geschwindigkeit der Stoffwechselwege aus den Aminosäuren deren Konzentration proportional

Tabelle 7: Konzentrationen von Körpersubstanzen, Gesamtaktivitäten (% der injizierten Aktivität) sowie die Menge Aminosäuren (mg), die pro Tier u. Stunde in die Stoffklassen inkorporiert bzw. umgewandelt oder als CO_2 veratmet wurde (Berechnung siehe Text) bei Krebsen, denen nach 23-stündiger Hälterung in Salz- bzw. Süßwasser $2{,}27 \cdot 10^6$ Ipm eines ^{14}C-Aminosäuregemisches injiziert wurde. Stoffbestand und Aktivitäten sind im Zeitpunkt 1 Stunde nach Injektion = 24 Stunden nach Beginn der osmotischen Adaptation angegeben.

	Salzwassertiere	Süßwassertiere	Stat. Signif. P der Differ.
gesamtes CO_2			
Gesamtaktivität	$5{,}5 \pm 1{,}9$	$5{,}6 \pm 1{,}0$	$> 0{,}05$
veratm. Aminos.	$4{,}9 \pm 1{,}7$	$4{,}4 \pm 1{,}0$	$> 0{,}05$
Lipid			
mg/Tier	155 ± 12	150 ± 23	$> 0{,}05$
Gesamtaktivität	$1{,}7 \pm 0{,}5$	$1{,}3 \pm 0{,}5$	$> 0{,}05$
inkorp. Aminos.	$1{,}5 \pm 0{,}6$	$1{,}0 \pm 0{,}4$	$< 0{,}01$
Polysaccharid			
mg/Tier	63 ± 36	64 ± 30	$> 0{,}05$
Gesamtaktivität	$1{,}5 \pm 0{,}5$	$1{,}7 \pm 0{,}4$	$> 0{,}05$
inkorp. Aminos.	$1{,}5 \pm 0{,}4$	$1{,}3 \pm 0{,}3$	$> 0{,}05$
Protein			
mg/Tier	943 ± 85	903 ± 101	$> 0{,}05$
Gesamtaktivität	$42{,}1 \pm 1{,}7$	$45{,}0 \pm 2{,}0$	$< 0{,}0027$
inkorp. Aminos.	$37{,}6 \pm 3{,}5$	$35{,}6 \pm 2{,}8$	$> 0{,}05$
Aminosäuren			
mg/Tier	$61{,}0 \pm 7{,}1$	$52{,}2 \pm 4{,}4$	$< 0{,}0027$
Gesamtaktivität	$46{,}7 \pm 1{,}5$	$43{,}5 \pm 2{,}3$	$< 0{,}0027$
umgewand. Aminos.	$47{,}5 \pm 4{,}7$	$44{,}7 \pm 4{,}1$	$> 0{,}05$
Neutralzucker			
mg/Tier	50 ± 18	25 ± 12	$< 0{,}0027$
Gesamtaktivität	$1{,}0 \pm 0{,}3$	$0{,}9 \pm 0{,}1$	$> 0{,}05$
inkorp. Aminos.	$0{,}9 \pm 0{,}3$	$0{,}7 \pm 0{,}1$	$< 0{,}05$
organische Säuren			
Gesamtaktivität	$1{,}4 \pm 0{,}3$	$1{,}6 \pm 0{,}4$	$> 0{,}05$
inkorp. Aminos.	$1{,}3 \pm 0{,}3$	$1{,}2 \pm 0{,}4$	$> 0{,}05$

ist.

Über die Kinetik des Aminosäurestoffwechsels in Abhängigkeit von der vorhandenen Aminosäurekonzentration gibt es in der Literatur nur wenige Angaben. MUNRO beschrieb 1969 in einer kurzen Zusammenfassung die Adaptation des Proteinmetabolismus bei Säugern an die vorliegende Aminosäurekonzentration. Abhängig von der Nahrungsaufnahme gibt es diurnale Variationen des Proteinmetabolismus. Nach einer Proteinnahrung steigt in der Leber die Konzentration der freien Aminosäuren, die zu einer schnellen Bildung eines löslichen hepatischen Proteins führt. Sie ist begleitet von einer Accumulation von Polysomenaggregaten und einer Verminderung dimerer und monomerer Ribosomen und Ribosomenuntereinheiten. In der Säugerleber ist also ziemlich sicher die Proteinsynthese von dem Angebot an freien Aminosäuren abhängig.

Überraschend hoch ist die Austauschrate zwischen den Aminosäuren und dem Protein, die mit Hilfe der vorliegenden Werte kalkuliert werden kann. Wenn ca. 36 mg Aminosäuren pro Stunde ins Protein eingebaut werden, so müßte die Hälfte des Gesamtproteins von ca. 1000 mg bereits nach 14 Stunden durch neu eingebaute Aminosäuren ersetzt sein. Auf S. 26 wurde der Einbau von ^{14}C-Glutamat ins Protein geschildert. (SPECK und URICH, 1969 b) Daraus wurde geschlossen, daß ca. 5,5 mg Aminosäuren pro Stunde eingebaut werden, so daß in diesem Fall die Hälfte des Proteins nach ca. 91 Stunden ausgetauscht wäre. Diese zahlenmäßige Diskrepanz wird dadurch verständlich, daß Glutamat wohl doch nicht mit der Geschwindigkeit eines Aminosäuregemisches ins Protein eingebaut wird, sondern als stoffwechselzentrale Aminosäure einer Reihe von Umwandlungsprozessen unterliegt. Zum anderen wurde die Aktivität im Protein 3 Stunden nach der Glutamatinjektion bestimmt, so daß mit einer Rückführung von inkorporiertem Glutamat durch Proteolyse besonders bei kurzlebigen Proteinen gerechnet werden muß. Bei den von mir ermittelten Zahlen handelt es sich , wie oben beschrieben, nur um Relativwerte,

die als grobe Schätzwerte angesehen werden müssen und nur zur Beantwortung der von mir gestellten Fragen dienen sollen. Die von SPECK und URICH (1969 c) ermittelte Halbwertszeit der Gesamtproteine in den meisten Organen des Flußkrebses von 8,5 - 19 Tagen kann noch weniger mit den von mir gefundenen Werten verglichen werden. Abgesehen von der mathematischen Herleitung von Halbwertszeiten werden die an einem Tier ermittelten Werte mit einer Verkürzung der Versuchsdauer kleiner. Die Halbwertszeiten der Krebsproteine wurden über 17 und 47 Tage bestimmt, während die Dauer meines Versuches eine Stunde betrug. Die Veränderung von Halbwertszeiten mit der Dauer des Versuches liegt daran, daß mit zunehmender Versuchsdauer der Anteil der Proteine mit kurzen Turnoverzeiten an der Gesamtaktivität immer mehr abnimmt.

Da die geschilderten Veränderungen des Aminosäure-Protein-Stoffwechsels keine Verringerung der Einbaurate bedeuten, sondern vielmehr eine konzentrationsabhängige Erhöhung, muß geschlossen werden, daß der Proteinabbau selbst die erhöhte Einbaugeschwindigkeit überwiegt. Sicherlich wird die Konzentration der freien Aminosäuren bei Salzwassertieren nicht dadurch erhöht, daß bei konstantem Ausbau der Einbau von Aminosäuren gebremst ist. Sowohl aus den von mir gefundenen Werten als auch aus der vorliegenden Literatur wird deutlich, daß zumindest die Einbaugeschwindigkeit ins Protein, wahrscheinlich aber auch die Umwandlung in andere Stoffklassen der vorliegenden Aminosäurekonzentration direkt proportional ist. Die Veränderungen im Proteinstoffwechsel können möglicherweise so reguliert werden, daß durch die Wirkung von Salzen in der Zelle die proteolytischen Enzymaktivitäten erhöht werden. Die Folge wäre eine Konzentrationserhöhung von Aminosäuren aus dem Protein. Diese neue Aminosäurekonzentration könnte als Substraterhöhung für die enzymatischen Wege aus den Aminosäuren angesehen werden, die wegen des höheren Substratangebotes schneller ins Protein und in die anderen Stoffklassen führen. Es ist wahrscheinlich, daß quantitative Stoffwechselver-

änderungen während der osmotischen Adaptation nicht nur das Protein, sondern den ganzen Intermediärstoffwechsel betreffen. Vom Proteinstoffwechsel muß man annehmen, daß er insgesamt erhöht ist durch vermehrten Einbau und in noch stärkerem Maße vermehrten Ausbau von Aminosäuren aus dem Protein. Auf diese Weise tragen die Aminosäuren auch zur Konzentrationserhöhung der niedermolekularen Neutralzucker bei. Die durch Salze indirekt erhöhte Proteolyse müßte stets die Konzentrationserhöhung der freien Aminosäuren erhalten. Wenn die Krebse einen Teil des Stickstoffs der veratmeten Aminosäuren weiterverwenden, kann man durchaus mit einer parallelen Neusynthese von nicht-essentiellen Aminosäuren rechnen.

In den beschriebenen Versuchen wurde stets nur Gesamtprotein betrachtet. Sicherlich existieren in der Vielfalt der Proteine auch beim Krebs solche mit extrem kurzen Halbwertszeiten. Es liegt nahe, bevorzugt diesen Proteinen eine Beteiligung an osmotischen Adaptationsvorgängen zuzuschreiben. Ebenso könnte man auch den Organen des Flußkrebses eine unterschiedliche Rolle an einer solchen Regulation zuschreiben. Eine Möglichkeit wäre z.B., daß die Mitteldarmdrüse als Hauptspeicherorgan (URICH, 1961) die Masse von Nahrungsaminosäuren als lösliche und schnell mobilisierbare Proteine speichert und bei Bedarf als Plasmaprotein an die Haemolymphe abgibt, in der es an den Ort des Verbrauchs transportiert wird. Dafür würde auch die von SPECK und URICH (1970) beschriebene intensive Inkorporation resorbierter Aminosäuren in die Mitteldarmdrüse sprechen und die im Gegensatz zur intrazellulären Flüssigkeit geringe Konzentration von Aminosäuren in der Haemolymphe. Versuche über die unterschiedliche Beteiligung der Organe und der Proteinfraktionen könnten neben einer Untersuchung über den Mechanismus der Regulation von niedermolekularen Neutralzuckern sicherlich einen vertieften Einblick in die Veränderungen des Stoffwechsels bei der osmotischen Adaptation liefern.

In osmotischer Hinsicht sind auch die Versuche von

SPECK und URICH (unveröffentlicht) über die Häutung des Flußkrebses recht aufschlußreich. Zur Zeit der Häutung wird die Konzentration der freien Aminosäuren etwa verdoppelt. Den größten Absolutanteil an der Erhöhung haben Alanin, Arginin, Glutamat und Glycin, jedoch sind auch die Konzentrationen der essentiellen Aminosäuren erhöht. Offenbar erhöhen die Krebse zum Zeitpunkt der Häutung die Konzentration der freien Aminosäuren, um sehr rasch einen osmotischen Wassereinstrom zu bewirken, der ihr Volumen in der kurzen Zeit vergrößert, in der sie noch keinen festen Chitinpanzer gebildet haben. Die Konzentration der niedermolekularen Neutralzucker steigt nur geringfügig. Sie spielen hier in osmotischer Sicht wohl keine Rolle, da sie den neuen Chitinpanzer synthetisieren. Versuche über weitere Parallelen zwischen der Osmoregulation in einer zunehmenden äußeren Salzkonzentration und den Vorgängen während der Häutung könnten zu einem besseren Verständnis regulativer Mechanismen beim Flußkrebs führen.

Die Untersuchung von diurnalen Veränderungen der Proteinsynthese in Abhängigkeit zur Nahrungsaufnahme und damit zum Aminosäureangebot könnte vergleichende Betrachtungen des Proteinstoffwechsels zwischen Säugern und einem Vertreter der Wirbellosen ermöglichen.

Der Abbau von Proteinen, dessen Regulation und die experimentelle Technik hierzu bedürfen in wohl noch stärkerem Maße der Klärung.

VI. Zusammenfassung

1) Wird der Flußkrebs Orconectes limosus in künstliches Meerwasser mit der osmotischen Konzentration 650 mOsmol/l umgesetzt, dann steigt die mittlere Konzentration der freien Aminosäuren im ganzen Tier nach 1 Tag um 19 % und nach 10 Tagen um 77 %, die der niedermolekularen Neutralzucker um 93 bzw. 107 % und der durch niedermolekulare organische Substanzen und Salze verursachte osmotische Druck der gesamten Körperflüssigkeiten um 54 bzw. 80 % gegenüber den in Süßwasser gehaltenen Vergleichstieren. Auch die organischen Säuren sind offenbar vermehrt.

2) Ein bei Zimmertemperatur und ohne Futter gehaltener 20 g-Krebs baut innerhalb von 10 Tagen bei Hälterung in Süßwasser täglich 2,0 mg Polysaccharid ab, bei Hälterung in Salzwasser 1,8 mg. Der Lipidabbau beträgt täglich 5,3 mg (Süß) bzw. 5,2 mg (Salz) und der Proteinabbau 8,4 bzw. 13,5 mg. Die Salzwassertiere haben signifikant 5,1 mg mehr Protein täglich abgebaut, die freien Aminosäuren aber um 4,5 mg vermehrt. Die Tiere beider Versuchsgruppen scheiden täglich etwa 1 mg Stickstoff aus. Als Quelle der erhöhten Aminosäurekonzentration erweist sich somit das Protein. Die aus dem Nährstoffverbrauch ermittelte und vergleichsweise direkt gemessene CO_2-Produktion betrug täglich ca. 38 mg (Süß) bzw. 29 mg (Salz). Die Bilanz aus dem Nährstoffverbrauch, der CO_2-Produktion und der Stickstoffausscheidung bestätigt das Protein als Quelle der vermehrten freien Aminosäuren, die Erhöhung der Neutralzucker und der organischen Säuren bei den Salzwassertieren wird durch deren verringerte Stoffwechselintensität gedeckt.

3) Die Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin und ein nicht weiter fraktionierbares Gemisch aus Threonin, Serin, Glutamin und Asparagin haben entsprechend ihren höheren Ausgangskonzentrationen auch die größten Absolut-

erhöhungen, jedoch sind durchweg auch alle für den Krebs essentiellen Aminosäuren -soweit sie erfaßt wurden- vermehrt worden. Die Mindestmenge hydrolysierten Proteins wurde aus der Konzentrationserhöhung der essentiellen Aminosäuren mit Hilfe von Proteindaten berechnet. Sie beträgt ca. 27 mg/Tier nach 1 Tag und ca. 30 mg nach 10-tägiger Adaptationszeit.

4) Tracerversuche machen wahrscheinlich, daß die Aminosäuren nicht durch verminderten Einbau ins Protein, sondern durch eine Beschleunigung des ganzen Proteinstoffwechsels vermehrt werden, wobei wegen des erhöhten Einbaus von Aminosäuren ins Protein auf einen noch stärkeren Ausbau geschlossen wird.

Anhang: Material und Methoden

A. Tiermaterial und Hälterung

Für alle Versuche wurden männliche Orconectes limosus aus der Havel bei Berlin-Spandau verwendet, die frisch von Fischern gefangen oder einem Überwinterungskäfig entnommen worden waren. Für die Versuche wurde möglichst einheitliches Tiermaterial mit einem mittleren Frischgewicht von 12-18 g verwendet. Die Tiere wurden etwa 10 Tage an die Versuchstemperatur von 20-22°C akklimatisiert. Bis 3 Tage vor Versuchsbeginn wurden sie mit Rinderherz gefüttert; die Versuche selbst erfolgten stets unter Hungerbedingungen, um Differenzen auf Grund unterschiedlicher Nahrungsaufnahme oder -ausnutzung zu vermeiden. Die Süßwassertiere wurden in Leitungswasser gehalten, die Salzwassertiere stets in künstlichem Meerwasser "Marke Seepferdchen". Hersteller: Labor W. Meyer, 221 Itzehoe. Nach Angaben des Herstellers ist dieses Salz aus 24 kristallisierten Einzelsalzen hergestellt. Das künstliche Meerwasser wurde 650 mosmolar verwendet, die Einstellung der Konzentration erfolgte mit einem Kryoskopiegerät mit thermoelektrischer Kühlung. Das Hälterungswasser (etwa 1 l pro Krebs) wurde belüftet und im Umlauf gefiltert.

Während der Häutung verändern sich beim Krebs die Konzentrationen der einzelnen Stoffklassen besonders schnell. Die Experimente wurden daher, um Häutungseinflüsse zu vermeiden, in der Zwischenhäutungsphase, d.h. im Winterhalbjahr durchgeführt. Darüber hinaus verändern sich die körpereigenen Substanzen auch im Jahresablauf erheblich. Osmoregulatorische Konzentrationserhöhungen werden mit Sicherheit auch von der vorliegenden Ausgangskonzentration abhängen. Die nachfolgende Tabelle gibt Auskunft über das Tiermaterial der einzelnen Versuche:

Versuchsgruppe	Anzahl pro Versuch	mittl. Frischgewicht (g)	Herkunft	Monat
a	3 • 15	20	Frischfang	Oktober
b	2 • 3	20	Frischfang	Oktober
c	2 • 4	12	Überwinterungskäfig	Januar
d	3 • 7	12	Überwinterungskäfig	Januar
e	2 • 16	12	Überwinterungskäfig	Februar
f	4 • 4	16	Frischfang	Mai

Da die Krebse selbst im Winterhalbjahr und unter gleichen Hälterungsbedingungen z.T. erhebliche individuelle Streuungen in den Konzentrationen der einzelnen Substanzen aufweisen, wurde zur statistischen Sicherung von Unterschieden, die sich durch Stoffwechseländerungen während der osmotischen Adaptation ergeben, der t-Test verwendet. (BELITZ, 1960; CAVALLI-SFORZA, 1969)

B. Aufarbeitung des Tiermaterials und Bestimmung der einzelnen Stoffklassen und Substanzen.

Vor und nach den Experimenten wurden Frischgewichtsbestimmungen durchgeführt, nachdem die Tiere 10 min auf trockenen Handtüchern vom anhaftenden Wasser weitgehend befreit worden waren. Tiere, deren Stoffbestand analysiert werden sollte, wurden durch Einfrieren bei -20°C getötet.

Die Aufarbeitung des Tiermaterials zur Bestimmung von Trockengewicht, Lipid, Polysaccharid, Protein, freien Aminosäuren und alkohollöslichen niedermolekularen Kohlenhydraten erfolgte nach den von SPECK und URICH (1969 a) angegebenen Verfahren, ebenfalls die Umrechnung aller Konzentrationen auf einen Krebs von 20 g Frischgewicht. Auf diesen "Standardkrebs" beziehen sich

alle Zahlenangaben der Tabelle und des Textes. Die Bestimmungen erfolgten stets am Stoffbestand ganzer Tiere.

An den nach SPECK und URICH (1969 a) isolierten "Intermediärprodukten", d.h. den nach Homogenisieren in 80 % Methanol, Zentrifugieren und Ausschütteln mit Chloroform in der wäßrig-methanolischen Phase enthaltenen Substanzen, wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

- osmotischer Druck durch Kryoskopie
- Trockengewicht und Asche an Sammelproben durch Gravimetrie
- Glucose mit dem UV-Test (Hexokinase-Methode) der Firma Boehringer, Mannheim

Die weitere Fraktionierung der "Intermediärprodukte" mit Ionenaustauschern in neutrale anthronpositive Substanzen (niedermolekulares Kohlenhydrat), ninhydrinpositive Substanzen (freie Aminosäuren) und organische Säuren erfolgte nach SPECK und URICH (1969 b). Die Bestimmung der organischen Säuren erfolgte rechnerisch aus der Differenz zwischen Trockengewicht der "Intermediärprodukte" einerseits und Asche + Aminosäuren + Neutralzucker andererseits.

Die niedermolekularen Neutralzucker wurden nach SPECK (1969) an Sammelproben dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und bestimmt.

Die Aminosäuren wurden mit dem automatischen Aminosäureanalysator BIOCAL-200 des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik im Einsäulenverfahren aufgetrennt und bestimmt.*

* Dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Aminosäureanalyse.

C. Bestimmung des ausgeschiedenen CO_2.

Je 3 Tiere der Versuchsgruppe b (Anhang A) wurden in 600 ml Salz- oder Süßwasser in verschlossenen Behältern gehalten, die mit CO_2-freier Luft durchströmt wurden. Die entweichende Luft enthielt das veratmete CO_2 und wurde in 350 ml 1,4 N KOH aufgefangen. Nach Versuchsende wurden die Tiere entnommen, das Hälterungswasser mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und weiter durchströmt. So wurde das gesamte CO_2, einschließlich des im Wasser gelösten, in KOH aufgefangen und als $BaCO_3$ gravimetrisch bestimmt. Für Korrekturzwecke wurde das schon vor Versuchsbeginn im Wasser vorhandene CO_2 bestimmt. (verändert nach SPECK und URICH, 1969 b)

D. Bestimmung des ausgeschiedenen Stickstoffs.

Je 4 Tiere der Versuchsgruppe c (Anhang A) wurden in Salz- oder Süßwasser in verschlossenen und belüfteten Einzelgefäßen gehalten. (125 ml Wasser pro Tier) Täglich wurde das Wasser gewechselt und direkt im Hälterungswasser Ammoniak colorimetrisch mit dem Harnstoff-Farbtest der Firma Boehringer, Mannheim, unter Fortlassen der Urease und Gesamtstickstoff als Reststickstoff nach STEGEMANN und LOESCHKE (1962)(zitiert aus ANDREWS, 1967) in der Modifikation von ANDREWS bestimmt.

E. Radioaktivitätsbestimmungen.

2 Gruppen von je 16 Tieren der Versuchsgruppe e (Anhang A) wurden 23 Stunden in Salz- oder Süßwasser gehalten. Anschließend wurden den Krebsen 0,025 ml eines trägerfreien ^{14}C-Aminosäuregemisches (The Radiochemical Centre, Amersham) mit $2{,}27 \cdot 10^6$ Ipm in Harreveldlösung in den Pericardialsinus injiziert. Volumen und Aminosäurekonzentration der Injektionslösung waren so bemessen, daß die Konzentration der Körperflüssigkeiten und ihr Volumen um weniger als 1 % vermehrt wurden. Nach der Injektion verblieben die Tiere 1 Stunde in 250 ml Salz- oder Süßwasser, pH 7,8, in verschlossenen 500 ml-Plastikfla-

schen. Anschließend wurden die Tiere schnell auf Filterpapier getrocknet und in -70°C Heptan getötet. Zur weiteren Aufarbeitung wurden sie bei -20°C gelagert.

Die Aufarbeitung des Tiermaterials und die chemische Bestimmung der einzelnen Stoffklassen erfolgte entsprechend den Angaben des Anhangs B. Bestimmungen wurden an Lipid, Polysaccharid, Protein, Aminosäuren und Neutralzuckern durchgeführt. An diesen Stoffklassen und zusätzlich an CO_2 und organischen Säuren wurde auch die Radioaktivität bestimmt.

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler der Firma Tracerlab. Als Scintillationslösung diente ein Toluol-Methanol-Gemisch im Verhältnis 8:2 mit 50 mg POPOP und 4 g PPO/l. Die Quenchkorrektur erfolgte nach dem Kanalverhältnis.

Direkt im Hälterungswasser wurde die gesamte Radioaktivität, bestehend aus Aminosäureverlusten bei der Injektion und freiem CO_2, mit Bray's solution als Scintillationslösung bestimmt. Durch Ansäuern des Hälterungswassers mit konzentrierter Essigsäure wurde das gelöste CO_2 ausgetrieben. Die restliche Aktivität ergibt die Verluste bei der Injektion.

Zur Bestimmung des gebundenen CO_2 wurde ein Aliquot des Homogenats mit konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und das entweichende CO_2 direkt in Äthanolamin überführt. 0,5 ml dienten zur Aktivitätsbestimmung.

Lipid wurde nach der Wägung in Chloroform gelöst und mit Scintillationslösung versetzt.

Die anderen wasserlöslichen Substanzen wurden in wäßriger Lösung belassen. Je 0,05 ml wurden in 0,5 ml Methanol überführt und dienten nach Zugabe von Scintillationslösung zur Aktivitätsbestimmung.

Literaturverzeichnis

ANDREWS, P. (1967): Über den Blutchemismus des Flußkrebses Orconectes limosus und seine Veränderungen im Laufe des Jahres. Z. vergl. Physiol. 57, 7-43

BELITZ, H.J. (1960): Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
Der Mathematikunterricht 3, 83-103

BINNS, R. (1969): The physiology of the antennal gland of Carcinus maenas. J. exp. Biol. 51, 1-46

CAMIEN, M.N., SARLET, H., DUCHATEAU, G. and FLORKIN, M. (1951): Non-protein amino acids in muscle and blood of marine and fresh-water Crustacea.
J. biol. Chem. 193, 881-885

CAVALLI-SFORZA, L. (1969): Biometrie - Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

DUCHATEAU, G. et FLORKIN, M. (1956): Système intracellulaire d´acides aminés libres et osmoregulation des Crustacés. J. de Physiol. (Paris), 48, 520

DUCHATEAU-BOSSON, G. and FLORKIN, M. (1961): Change In Intracellular Concentration Of Free Amino Acids As A Factor Of Euryhalinity In The Crayfish Astacus Astacus.
Comp. Biochem. Physiol. 3, 245-249

EMERSON, D.M. (1969): Influence of salinity on ammonia excretion rates and tissue constituants of euryhaline invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 29, 1115-1133

FLOREY, E. (1970): Lehrbuch der Tierphysiologie
Gustav Thieme Verlag, Stuttgart

FLORKIN, M., DUCHATEAU-BOSSON, G., JEUNIAUX, Ch. et SCHOFFENIELS, E. (1964): Sur Le Méchanisme De La Régulation De La Concentration Intracellulaire En Acides Aminés Libres, Chez Eriocheir Sinensis Au Cours De L`Adaptation Osmotique.
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 72, 892-906

FLORKIN, M. and SCHOFFENIELS, E. (1965): Euryhalinity

and the Concept of Physiological Radiation. In: MUNDAY, K.A. (Edit.), Studies in Comparitive Biochemistry, Oxford: Pergamon Press.

FLORKIN, M. and SCHOFFENIELS, E. (1969): Anisosmotic Extracellular and Isosmotic Intracellular Regulations as Examples of Physiological Radiations of Biochemical Systems. In: FLORKIN, M. and SCHOFFENIELS, E. (Edit.), Molecular Approaches to Ecology, New York, London: Academic Press

FRASER, D., KERMACK, W.O., LEES, H. and WOOD, J.D. (1952): Non-protein fraction of the flesh of lobster and crabs. Biochem. J. 51, 32

GILLES, R. et SCHOFFENIELS, E. (1968): Influence du NH_4Cl et du sulfate de vératrine sur la synthèse et le pool des acides aminés au niveau de la chaine nerveuse ventrale de deux Crustacés (Homarus vulgaris M. Edw. et Astacus fluviatilis F.)
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 76, 452-464

HARRIS, R.R. (1969): Free amino acid and hemolymph concentration changes in Sphaeroma rugicauda during adaptation to a dilute salinity. J. exp. Biol. 50, 319-326

HERRMANN, F. (1931): Über den Wasserhaushalt des Flußkrebses (Potamobius astacus Leach.)
Z. vergl. Physiol. 14, 479-534

LANGE, R. (1968): Isosmotic Intracellular Regulation. Nyt. Mag. Bot. 16, 1-13

KANESHIRO, E.S., HOLZ, G.G. Jr. and DUNHAM, P.B. (1969): Osmoregulation in a marine ciliate Miamiensis avidus. II. Regulation of intracellular free amino acids. Biol. Bull. 137, 161-169

KING, E. (1965): The Oxygen Consumption Of Intact Crabs And Excised Gills As A Function Of Decreased Salinity. Comp. Biochem. Physiol. 15, 93-102

KING, E. (1966): Oxidative Activity Of Crab Gill Mitochondria As A Function Of Osmotic Concentration. Comp. Biochem. Physiol. 17, 245-258

MUNRO, H.N. (1969): Adaptation of Mammalian Protein Metabolism to Amino Acid Supply. Biochem. J. 113, 1 P

RAO, G.M.M., DEEKARAMAN, M. and BABU, S.J. (1969): Effect of Salinity on the Free Amino Acid Composition of the Body Fluid of the Crab Sesarma plicatum. Curr. Sci. India 38, 296

SCHLIEPER, C. (1965): Praktikum der Zoophysiologie. 3. Aufl., Stuttgart

SCHWABE, E. (1933): Über die Osmoregulation verschiedener Krebse (Malacostraca). Z. vergl. Physiol. 19, 183-236

SHAW, J. (1958): Osmoregulation in the muscle fibres of Carcinus maenas. J. exp. Biol. 35, 920-929

SPECK, U. (1969): Das Kohlenhydratspektrum in den Organen des Flußkrebses Orconectes limosus und seine Veränderungen im Jahresablauf. Z. vergl. Physiol. 65, 51-69

SPECK, U. und URICH, K. (1969 a): Der Abbau körpereigener Substanzen in dem Flußkrebs Orconectes limosus während des Hungerns. Z. vergl. Physiol. 63, 410-414

SPECK, U. und URICH, K. (1969 b): Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs Orconectes limosus: Einbau von Glucose-U-^{14}C, Glutamat-U-^{14}C und Palmitat-U-^{14}C in die verschiedenen Stoffklassen. Z. vergl. Physiol. 63, 395-404

SPECK, U. und URICH, K. (1969 c): Der Turnover der Proteine in den Organen des Flußkrebses Orconectes limosus. Z. vergl. Physiol. 63, 405-409

SPECK, U. und URICH, K. (1970): Das Schicksal der Nährstoffe beim Flußkrebs Orconectes limosus. II. Resorption U-^{14}C-markierter Nährstoffe und ihre Verteilung auf die Organe. Z. vergl. Physiol. 68, 318-333

THOMPSON, M.H. and FARRAGUT, R.M. (1966): Amino acid composition of the chesapeake bay blue crab Callinectes sapidus. Comp. Biochem. Physiol. 17, 1065-1078

URICH, K. (1961): Mitteldarmdrüsen und Insektenfettkörper als Zentralorgan des Stoffwechsels. Erg. Biol. 157-190

ZANDEE, D.J. (1966): Metabolism in the Crayfish Astacus astacus (L.) I.- Biosynthesis of Amino Acids. Arch. Intern. Physiol. Biochim. 74, 35-44

Lebenslauf

Am 17. April 1939 wurde ich als Sohn des Stadtinspektors Friedrich Siebers und seiner Ehefrau Käthe, geb. Pollnow, in Stettin geboren.

In Lüneburg besuchte ich von 1946 bis 1950 die Grundschule, anschließend das städtische Gymnasium, an dem ich 1959 die Reifeprüfung ablegte.

1959 wurde ich Soldat in der Bundeswehr, aus der ich 1965 als Oberleutnant aus Gewissensgründen ausschied. Im Dezember 1963 heiratete ich in Berlin Fräulein Johanna Priebe.

Seit dem Sommersemester 1965 studiere ich an der Freien Universität Berlin Zoologie, bestand im Juli 1967 die Diplom-Vorprüfung und begann im Oktober 1968 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Urich meine Dissertationsarbeit am II. Zoologischen Institut.

Meine akademischen Lehrer waren in Zoologie die Herren Professoren Günther, Kümmel, Peus, Ulrich und Urich, in Botanik die Herren Professoren Poelt und Reinert. Genetik hörte ich bei Herrn Professor Lüers, Physik bei Herrn Professor Lassen und Chemie bei den Herren Professoren Gnichtel, Jahr und Manecke.